

- C. GEREZ und R. KIRSTEN, *Biochem. Z.* 337, 312 (1963). — 28. SACHSENMAIER, W., persönliche Mitteilung. — 29. HEPP, D., E. PRÜSSE, H. WEISS und O. WIELAND, *Biochem. Z.* 344, 87 (1966). — 30. CHANCE, B. und G. R. WILLIAMS, *J. biol. Chemistry* 217, 409 (1955). — 31. CHANCE, B. und G. R. WILLIAMS, *Advances in Enzymol.* 17, 65 (1956). — 32. KLINGENBERG, M., W. SLENCZKA und E. RITT, *Biochem. Z.* 332, 47 (1959). — 33. KLINGENBERG, M., persönliche Mitteilung. — 34. BODE, CH. und M. KLINGENBERG, *Biochem. Z.* 341, 271 (1965). — 35. BÜCHER, TH und W. RÜSSMANN, *Angew. Chem. Ausg. A (internat.)* 3, 426 (1964). — 36. CHANCE, B., P. COHEN, F. F. JÖBSIS und B. SCHOENER, *Science (Washington)* 136, 325 (1962). — 37. CHANCE, B., F. F. JÖBSIS, P. COHEN und B. SCHOENER, *Science (Washington)* 137, 499 (1962). — 38. CHANCE, B. und B. SCHOENER, in: *Symposium on Regulation of Enzyme Activity and Synthesis in Normal and Neoplastic Liver*, S. 169, Indianapolis, October 1962, Pergamon Press, New York (1963). — 39. CHANCE, B., J. R. WILLIAMSON, D. JAMIESON und B. SCHOENER, *Biochem. Z.* 341, 357 (1965). — 40. ESTABROOK, R. W. und S. P. NISSLEY, in: *Funktionelle und morphologische Organisation der Zelle*, S. 119, Springer-Verlag, Berlin—Göttingen—Heidelberg (1962). — 41. BÜCHER, TH. und M. KLINGENBERG, *Angew. Chem. Ausg. A* 70, 552 (1958). — 42. PETTE, D., *Naturwissenschaften* 52, 597 (1965). — 43. SCHIMASSEK, H., *Biochem. Z.* 336, 460 (1963). — 44. HOHORST, H. J., F. H. KREUTZ und TH. BÜCHER, *Biochem. Z.* 332, 18 (1959). — 45. SPROEGEL, E., *Dissertation Med. Fak., Marburg/L.* (1962).

Dr. R. Scholz

Physiol.-chem. Institut der Universität  
8 München 15, Goethestr. 33

## Die Jod<sup>131</sup>-Markierung von Insulin, ACTH und STH mit hoher spezifischer Aktivität zur Anwendung in der radioimmunologischen Methode<sup>1)</sup>

Von F. MELANI<sup>2)</sup>, K. M. BARTELT, R. CONRADS und E. F. PFEIFFER

*Aus der Abteilung für Klinische Endokrinologie (Leiter: Prof. Dr. E. F. Pfeiffer) der I. Medizinischen Universitätsklinik Frankfurt am Main (Direktor: Prof. Dr. F. Hoff)*

(Eingegangen am 23. August 1965)

Für die Markierung von Insulin, ACTH und STH mit J<sup>131</sup> wurden NaJ<sup>131</sup> und Chloramin T als Oxydationsmittel benutzt. Mit dieser Methode läßt sich eine spezifische Radioaktivität von etwa 300—500 mC/mg erreichen. Nach der Markierung enthalten die Jod<sup>131</sup>-Hormonpräparationen 10—25% unspezifische Radioaktivität. Die Degradationsprodukte wurden an Serumproteine adsorbiert und auf „Sephadex“-Säulen von Hormon-Jod<sup>131</sup> getrennt. Nach zwei Reinigungen lag die unspezifische Radioaktivität bei Insulin-J<sup>131</sup> und ACTH-J<sup>131</sup> stets unter 5—6%, während sie bei STH-J<sup>131</sup> immer wesentlich höher war. — Es wurde niemals eine Bindung des intakten Insulin-J<sup>131</sup>- und ACTH-J<sup>131</sup>-Moleküls an Serumproteine beobachtet. Beim STH konnte hingegen nicht mit Sicherheit entschieden werden, ob das intakte STH-J<sup>131</sup>-Molekül an Serumproteine gebunden wird oder nicht.

Die Möglichkeiten und Grenzen der radioimmunologischen Bestimmung von Eiweißhormonen im Blut werden aufgeführt.

NaI<sup>131</sup> and chloramine T were used as oxidising agents for labelling insulin, ACTH and STH with I<sup>131</sup>. A specific radioactivity of about 300—500 mC/mg was obtained with this method. After labelling, the I<sup>131</sup>-hormone preparations contain 10—25% of unspecific radioactivity. The degradation products were adsorbed onto serum proteins and separated from hormone-I<sup>131</sup> on „Sephadex“ columns. After two purifications, the unspecific radioactivity with insulin-I<sup>131</sup> and ACTH-I<sup>131</sup> was always below 5—6%, but it was always essentially higher with STH-I<sup>131</sup>. Binding of the intact insulin-I<sup>131</sup> and ACTH-I<sup>131</sup> molecules to serum protein was never observed. It is not certain, however, whether the STH-I<sup>131</sup> molecule is bound to serum protein or not.

The possibilities and limits of the radio-immunological determination of protein hormones in blood are discussed.

Die wegen ihrer Empfindlichkeit und Genauigkeit geschätzten radioimmunologischen Verfahren zur Bestimmung von Hormonen im Blut haben in den letzten Jahren weite Verbreitung gefunden. Wenn sich die verschiedenen Methoden in der Technik auch beträchtlich unterscheiden, bauen sie doch alle auf dem gleichen Prinzip auf, das von YALOW und BERSON (1) erstmalig für die Bestimmung von Insulin im Blut nutzbar gemacht worden ist: in einer Gleichgewichtsreaktion wird Jod<sup>131</sup>-markiertes und nicht markiertes Hormon von spezifischen Antikörpern kompetitiv gebunden. In einem System, in dem die Konzentration der Antikörper und des Jod<sup>131</sup>-markierten Hormones konstant und die Konzentration des nicht markierten Hormones variabel gehalten werden, ist das Verhältnis von antikörperge-

bundenem (B) und freiem (F) Jod<sup>131</sup>-Hormon eine Funktion des nicht markierten Hormones.

Die zur Ermittlung des Quotienten B/F erforderliche Trennung von antikörpergebundenem und freiem Hormon kann auf verschiedene Weise bewerkstelligt werden: mit der Papierelektrophorese (1, 2), durch Fällung des Antigen-Antikörperkomplexes mit Natriumsulfat (3) oder mit einem gegen den hormonspezifischen Antikörper gerichteten zweiten Antikörper (4, 5, 6). Einige dieser Techniken (7, 1, 2) sind auf Jod<sup>131</sup>-Hormonpräparate mit hoher spezifischer Radioaktivität angewiesen, während andere (3, 4, 5) mit niedrig markierten Hormonen auskommen. In jedem Fall aber erlaubt die Verwendung von hoch markierten Hormonen, die Konzentration des Tracers klein zu halten und damit die Empfindlichkeit der Methode zu erhöhen.

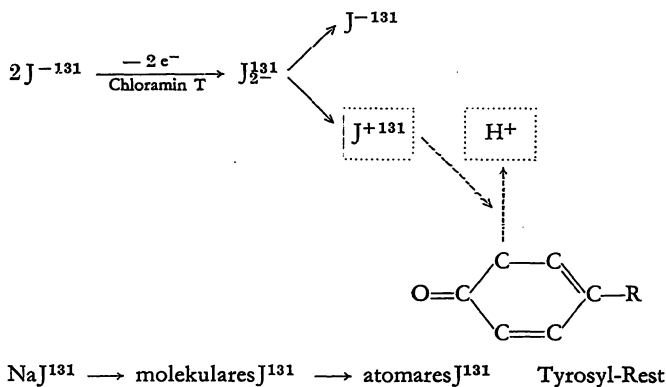
Eine weitere Technik bedient sich des Anionenaustauschers zur Trennung von antikörpergebundenem und

<sup>1)</sup> Durchgeführt mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Bad Godesberg.

<sup>2)</sup> Stipendiat der Alexander-von-Humboldt-Stiftung 1963/65.

freiem Jod<sup>131</sup>-Hormon. In alkalischem Milieu bindet er unter Abgabe seines ursprünglichen Gegenions selektiv freies Hormon, nicht aber den Antigen-Antikörperkomplex (8, 9, 10). Die nicht an den Anionenaustauscher gebundene, sondern nach Zentrifugation im Überstand verbleibende Radioaktivität entspricht somit dem antikörpergebundenen Jod<sup>131</sup>-Hormon (B). Aus der Differenz (Gesamtaktivität — B) läßt sich das freie Hormon (F) und damit auch der Quotient B/F ermitteln.

Zur Markierung von Insulin, ACTH und STH benutzten wir die von GREENWOOD und Mitarbeitern (11) für die Markierung von Wachstumshormon beschriebene Methode. Sie verwendet NaJ<sup>131</sup> und das Oxydationsmittel Chloramin T, welches das Jodid<sup>131</sup> in atomares Jod<sup>131</sup> umwandelt, das dann die — in Abbildung 1 schematisch dargestellte — Substitutionsreaktion am Tyrosylrest vollzieht.



Schematische Darstellung der Markierungsreaktion

Jodid<sup>131</sup> wird durch das Oxydationsmittel Chloramin T zu atomarem bzw. molekularem Jod<sup>131</sup> umgewandelt, welches in einer Substitutionsreaktion gegen ein Wasserstoffatom des Tyrosylrestes ausgetauscht wird

Im Laufe der Markierung entstehen durch die energiereiche Strahlung und durch chemische Veränderungen des Hormonmoleküls radioaktive Degradationsprodukte, die, unspezifisch an Serumproteine gebunden, bei der Bestimmung als antikörpergebundenes Jod<sup>131</sup>-Hormon wirken und das wahre Verhältnis B/F zugunsten von B verändern. Zur Vermeidung von Fehlbestimmungen muß deshalb das verwendete Jod<sup>131</sup>-Hormonpräparat von solchen Degradationsprodukten befreit werden. Es ergeben sich somit einige Forderungen, die von der radioimmunologischen Methode an die Hormonmarkierung gestellt werden:

Erhaltung der immunologischen Eigenschaften des Hormonmoleküls

Hohe spezifische Radioaktivität

Begrenzung des Anteils an unspezifischer Radioaktivität in der Jod<sup>131</sup>-Hormonpräparation.

In dieser Arbeit werden unsere Erfahrungen mit der Markierung und Reinigung von Insulin, ACTH und Wachstumshormon sowie mit der Tauglichkeit der so gewonnenen Präparate für radioimmunologische Bestimmungen dargelegt.

## Methodik

Für unsere Versuche wurden folgende *Hormone* benutzt: Menschen-Insulin (23,5 E/mg, Fa. NOVO Kopenhagen), Schweine-ACTH (106 E/mg, Fa. Farbwerke Hoechst und ACTH A<sub>1</sub>-27550 von Fa. Organon G. m. b. H.) und Menschen-STH (hergestellt von REISEL und Mitarbeitern von Merck Sharp and Dohme Research Laboratories, Rahway, New Jersey aus den von uns über-sandten acetongetrockneten Hypophysen).

## Antiseren

Zur Gewinnung von Anti-Insulin-Serum wurden Meerschweinchen mit unserer, an anderer Stelle beschriebenen Methode immunisiert (9, 10). Anti-ACTH-Serum wurde erzeugt, indem Kaninchen in Abständen von drei Wochen mit 1 ml einer Emulsion, die sich zu gleichen Teilen aus ACTH-Lösung (20 mg in 10 ml Phosphatpuffer, pH 6,4) und Bacto Adjuvant Complete H 37 Ra (Difco Laboratories, Detroit, USA) zusammensetzte, über einen Zeitraum von sechs Monaten immunisiert wurden.

Zur Gewinnung von Anti-STH-Serum wurden Kaninchen im Abstand von zehn Tagen mit 1 ml einer Emulsion, die zu gleichen Teilen aus STH-Lösung (10 mg in 10 ml 0,03N HCl) und Bacto Adjuvant Complete H 37 Ra bestand, viermal immunisiert. Danach wurden an zwei aufeinanderfolgenden Tagen jeweils 1 mg STH intravenös verabreicht. — Alle Tiere wurden 14 Tage nach der letzten Immunisierung entblutet, die Seren wurden, in kleine Portionen aufgeteilt, bei — 25° bis zum Gebrauch eingefroren.

## Sephadex

Sephadex G-50 Medium, G-75 und G-100 (Pharmacia Uppsala, Schweden) wurden den Vorschriften entsprechend gequollen und dann in Büretten (1 × 80 cm), die am unteren Ende mit Glaswolle verschlossen waren, eingefüllt. Vor Gebrauch wurden die Säulen mit 0,07M Veronalnatriumpuffer äquilibriert und mit 1 ml einer 2-proz. Albuminlösung gesättigt.

## Anionenaustauscher

Als Anionenaustauscher wurde Amberlite CG-400 I (Serva, Heidelberg) verwendet. Bei Lieferung enthält das Harz als Gegenion Cl<sup>-</sup>. Vor Gebrauch wurde das Cl<sup>-</sup> durch Hydroxylgruppen ersetzt, indem 1 Teil des Harzes mit 8 Teilen (v/v) einer 2N NaOH zwei Stunden lang verrührt und anschließend über einer Fritte so lange mit aqua destillata gewaschen wurde, bis der pH-Wert des Waschwassers unter 8 gesunken war. Der so präparierte Ionenaustauscher wurde an der Luft getrocknet und verschlossen aufbewahrt.

## Markierung der Hormone mit J<sup>131</sup>

Nach der von GREENWOOD und HUNTER angegebenen Methode wurden Insulin, ACTH und STH in der im folgenden beschriebenen Weise markiert:

In das Originalfläschchen, in dem 0,05 ml NaJ<sup>131</sup> (IBS 3) mit einer Gesamtaktivität von 2—4 mC vom Radiochemical Center Amersham, England, geliefert werden, wurde nacheinander mit Mikropipetten eingebracht:

1. 0,025 ml 0,5M Phosphatpuffer, pH 7,5
2. 0,005 mg des zu markierenden Hormons in 0,025 ml 0,03N HCl
3. 0,1 mg Chloramin T in 0,025 ml 0,05M Phosphatpuffer 10—30 Sek. schütteln
4. 0,24 mg Natriumdisulfit in 0,1 ml 0,05M Phosphatpuffer
5. 2,0 mg Kaliumjodid in 0,2 ml 0,05M Phosphatpuffer.

Zur Reinigung wurden 0,3 ml des Markierungs-Reaktionsgemisches mit 0,2 ml Kontrollserum inkubiert, dem zuvor zum Schutz des Hormons (Insulin und STH) 0,5% Jodacetamid und zur Sichtbarmachung der Proteine 0,01% Bromphenolblau-Lösung zugesetzt worden waren. Die Trennung des Hormons von den Serumproteinen mit den adsorbierten Degradationsprodukten und von überschüssigem NaJ<sup>131</sup> erfolgte auf Sephadex-Säulen.

### Reinigungskontrolle mit Anionenaustauschern

2,0 ml von der Stammlösung des zu testenden Hormons wurden mit 2,0 ml 0-proz. albuminhaltigem Veronalpuffer (0,1M) bzw. mit 1,0 ml des Puffers und 1,0 ml Kontrollserum 30 Min. lang inkubiert. Nach Ermittlung der Gesamtradioaktivität in einem Bohrlochkristallzähler (Fa. „Tracerlab“ Inc., USA) und Zusatz von 200 mg des präparierten Ionenaustauschers zu jeder Probe wurden die Röhrchen 30 Min. lang geschüttelt. Die Proben wurden dann kurz zentrifugiert und die Radioaktivität von 2 ml des Überstandes gemessen. Sie entspricht der Hälfte der im Überstand enthaltenen unspezifischen Radioaktivität.

### Radiopapierelektrophorese

Die elektrophoretische Trennung der Serumweißfraktionen erfolgte bei einer Temperatur von 18° auf Papierstreifen der Fa. Schleicher und Schüll Nr. 2043a Mgl. Die Spannung betrug 4 V/cm bei 18-Stunden-Elektrophorese und 16 V/cm bei vierstündiger Kurzelektrophorese. Die Proteine wurden mit Amidoschwarz angefärbt, die Verteilung der Radioaktivität des zugesetzten Jod<sup>131</sup>-Hormons auf die einzelnen Eiweißfraktionen mit einem Endfensterzählrohr mit gekoppeltem automatischem Schreiber (Fa. „Tracerlab“ Inc., USA) aufgezeichnet.

### Ergebnisse

Nach der Markierung des Hormons ist es notwendig, das Insulin aus dem Reaktionsgemisch auszusondern. Das niedermolekulare NaJ<sup>131</sup> kann nach der von GREENWOOD und Mitarbeitern angegebenen Methode (11) auf einer Sephadex-G-75-Säule abgetrennt werden. Hierbei findet man im Filtrat zwei Radioaktivitätsgipfel. Der erste entspricht dem Jod<sup>131</sup>-Insulin, der zweite dem leichteren NaJ<sup>131</sup>. Das NaJ<sup>131</sup> kann aber auch durch eine 1 stdg. bei 4° vorgenommene Dialyse gegen 2 l aqua destillata entfernt werden. Mit beiden Methoden gewinnt man ein Insulin-J<sup>131</sup>, das unserer Erfahrung nach noch zu viele im Laufe der Markierung entstandene Spaltprodukte enthält, die bei der radioimmunologischen Insulinbestimmung zu falschen Meßergebnissen führen. Mit Hilfe der Radiopapierelektrophorese lassen sich diese Degradationsprodukte, die unspezifisch an Serumproteine gebunden werden, von dem intakten Jod<sup>131</sup>-Insulinmolekül trennen. Während das intakte Hormonmolekül von der Zellulose des Papierstreifens am Startpunkt adsorbiert wird, wandern die unspezifisch gebundenen Spaltprodukte mit allen Serumweißfraktionen, vor allem mit den  $\alpha_2$ -Globulinen (Abb. 2). Diese unspezifische Radioaktivität reagiert nicht mit Anti-Insulin-Serum.

Zur Reinigung wird das Insulin-J<sup>131</sup> mit Bromphenolblau-gefärbtem Serum versetzt und auf einer Sephadex-G-75-Säule filtriert. Im milliliterweise gesammelten Filtrat erscheinen zuerst die an Serumproteine gebundenen Degradationsprodukte, danach das gereinigte Jod<sup>131</sup>-Insulin (Abb. 3). Nach ein oder zwei Reinigungen findet man im Radiopapierelektropherogramm nur noch einen scharfen, hormonspezifischen Radioaktivitätsgipfel, der am Startpunkt liegt, wenn das Insulin-J<sup>131</sup> zuvor mit Kontrollserum inkubiert worden war, nach Inkubation mit Anti-Insulin-Serum hingegen im Bereich der  $\gamma$ - und  $\beta$ -Globuline zu finden ist (Abb. 4). Quantitativ läßt sich die unspezifische Radioaktivität einer Jod<sup>131</sup>-Insulincharge mit Anionenaustauschern bestimmen. Unspe-

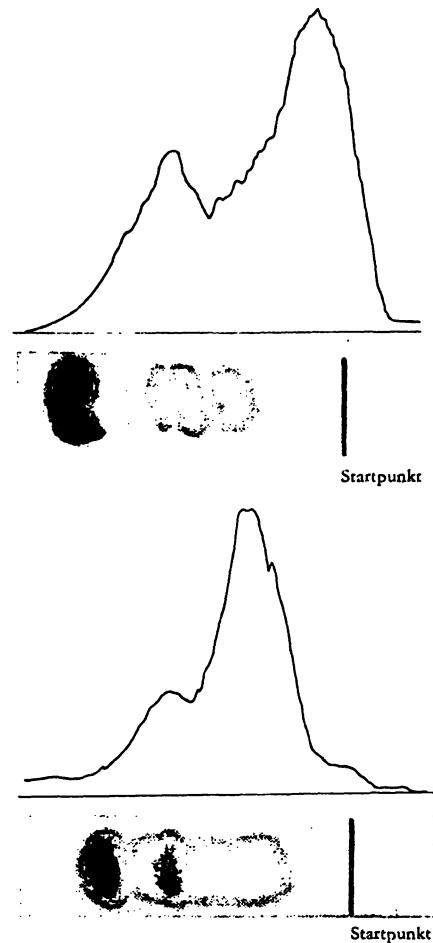


Abb. 2

Elektropherogramm eines Normalserums (oben) und eines Meer-schweinchen-anti-Menscheninsulin-Serums (unten) nach Inkubation mit ungereinigtem Jod<sup>131</sup>-Menscheninsulin (460 mC/mg)

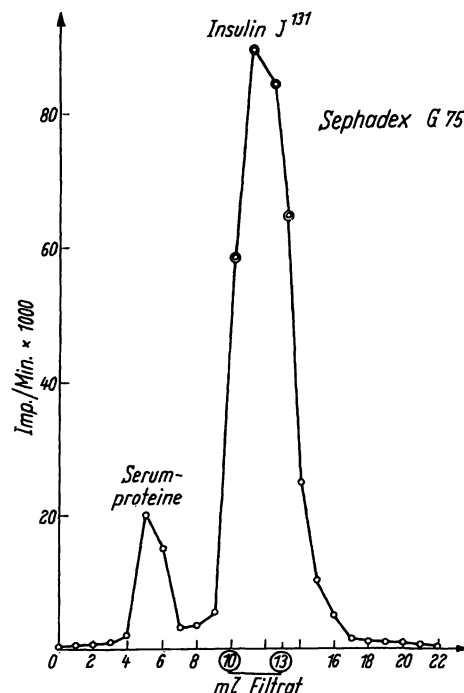


Abb. 3

Reinigung des J<sup>131</sup>-Insulin (Menscheninsulin, 460 mC/mg) auf einer Säule von Sephadex G-75 (15 x 1 cm). Der erste Gipfel entspricht den an Serumproteine gebundenen Degradationsprodukten, der zweite dem gereinigten J<sup>131</sup>-Insulin

zifisch an Albumin oder Serumproteine gebunden, wird sie nicht mehr vom Ionenaustauscher erfaßt, sondern bleibt nach der Zentrifugation im Überstand. Es ist zu beachten, daß sich die Verteilung der unspezifischen Ra-

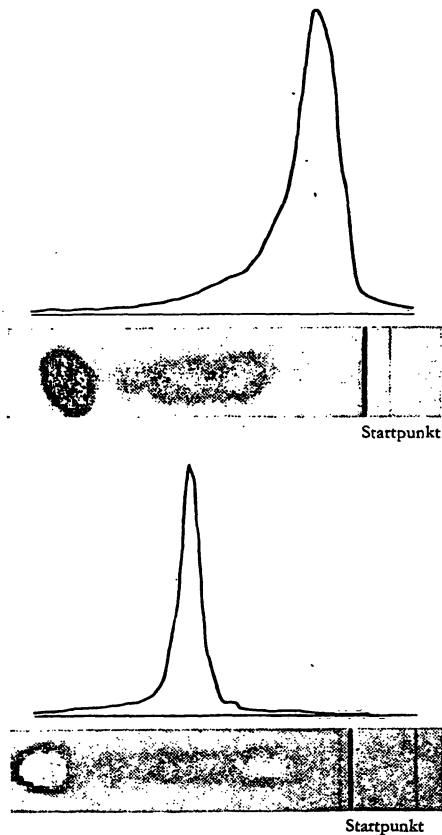


Abb. 4

Elektropherogramm eines Normalserums (oben) und eines Meerschweinchen-anti-Menscheninsulin-Serums (unten) nach Inkubation mit gereinigtem J<sup>131</sup>-Menscheninsulin (460 mC/mg)

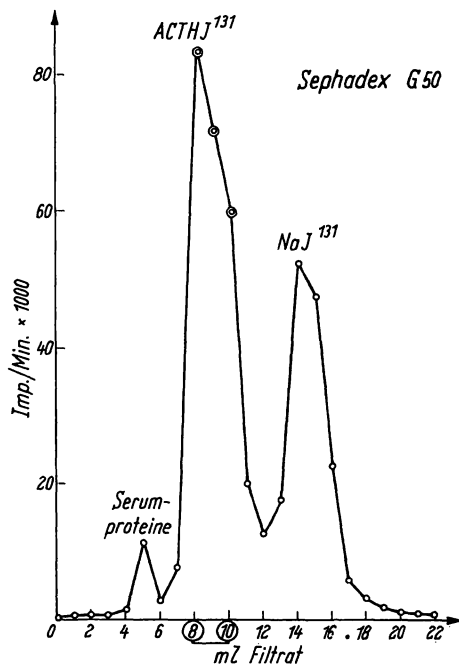


Abb. 5

Trennung des J<sup>131</sup>-ACTH (Schweine-ACTH A<sub>1</sub>, 430 mC/mg) von überschüssigem NaJ<sup>131</sup> und erste Reinigung auf einer Sephadex-G-50-Säule. Der erste Gipfel entspricht den an Serumproteine gebundenen Degradationsprodukten, der zweite dem J<sup>131</sup>-ACTH, der dritte dem NaJ<sup>131</sup>

dioaktivität auf Ionenaustauscher und Überstand mit der Konzentration des Albumins oder der Serumproteine im Lösungsmittel ändert. Bei Gebrauch eines Puffers mit niedriger Albuminkonzentration (0,5%) findet man die Degradationsprodukte fast gleichmäßig auf den Ionenaustauscher und den Überstand verteilt. Steigt die Albuminkonzentration im Puffer, so steigt auch die Radioaktivität im Überstand. Mit Albuminkonzentrationen von 3–5% erreicht die Adsorption einen Grenzwert, der durch weitere Zugabe von Albumin nicht mehr deutlich überschritten wird. Wie mit 1:4 verdünntem Serum sind praktisch alle Spaltprodukte an Protein adsorbiert und können in Seren auf diese Art als konstanter Faktor im Überstand gehalten werden. Diese Stabilisierung in der Verteilung der gebliebenen unspezifischen Radioaktivität ist für die Hormonbestimmung von Bedeutung, bei der serumhaltige Proben mit serumfreien Proben verglichen werden (Tab. 1).

Tab. 1

Einfluß von Albumin und Normalserum auf die Bindung verschiedener J<sup>131</sup>-Insulin-Präparate mit unterschiedlichem Reinheitsgrad an den Anionenaustauscher Amberlite. (Werte in % Radioaktivität im Überstand)

	Puffer + 0,4 % Rinder- Albumin	Puffer + 4 % Rinder- Albumin	normales Serum 1:4
Menschen-Insulin J <sup>131</sup> 280 mC/mg vor der Reinigung	10	22	28
Menschen-Insulin 280 mC/mg 1. Reinigung	4	12	15
Menschen-Insulin 280 mC/mg 2. Reinigung	1,5	4	5
Menschen-Insulin 420 mC/mg 2. Reinigung	3	5	4,8
Menschen-Insulin 350 mC/mg 2. Reinigung	1	3,8	3,5

Die aus 39 Aminosäuren aufgebaute Peptidkette des ACTH-Moleküls enthält zwei Tyrosingruppen, die unter optimalen Bedingungen jeweils zwei Moleküle Jod<sup>131</sup> aufnehmen können. Da ACTH kein Cystein und keine Disulfidbrücken enthält wie das Insulin, sollte es sich bei der Markierung gegenüber der oxydierenden Wirkung des Chloramin T weniger empfindlich zeigen. Gleichwohl findet man nach jeder Markierung in der J<sup>131</sup>-ACTH-Charge einen mehr oder weniger großen Anteil an unspezifischer Radioaktivität.

Wegen der günstigen Molekulargewichtsverhältnisse läßt sich die Trennung des ACTH-J<sup>131</sup> von überschüssigem NaJ<sup>131</sup> und von der unspezifischen Radioaktivität in einem Arbeitsgang erledigen. Zu diesem Zweck wird das nach der Markierung vorliegende Reaktionsgemisch mit Bromphenolblau-gefärbtem Serum versetzt und auf einer Sephadex-G-50-Säule filtriert. In dem milliliterweise gesammelten Filtrat findet man drei deutlich voneinander abgegrenzte Radioaktivitätsgipfel (Abb. 5). Der erste entspricht der an die Serumproteine

gebundenen unspezifischen Radioaktivität, der zweite dem ACTH-J<sup>131</sup>, der dritte dem überschüssigen NaJ<sup>131</sup>.

In der Radiopapieroelektrophorese wandert die unspezifische Radioaktivität wie beim Insulin-J<sup>131</sup> mit allen Serumeiweißfraktionen, besonders mit Albumin, während das intakte Hormonmolekül von der Zellulose des Papierstreifens am Startpunkt adsorbiert wird, wenn die Inkubation mit Kontrollserum erfolgt war (Abb. 6). Wie Abbildung 7 zeigt, findet man nach ein oder zwei Reinigungen des ACTH-J<sup>131</sup> im Radioelektropherogramm nur noch einen scharfen, nämlich den hormonspezifischen Aktivitätsgipfel. Nach Inkubation mit Kontrollserum liegt er am Startpunkt, nach Inkubation mit Anti-ACTH-Serum findet man ihn im Bereich der  $\gamma$ -Globuline.

Für die Verteilung der unspezifischen Radioaktivität in der Probe mit Anionenaustauschern gilt das gleiche wie für Insulin. Amberlite bindet freies ACTH-J<sup>131</sup>, nicht aber das antikörpergebundene Hormon und nicht die an Albumin oder andere Serumeiweiße adsorbierte unspezifische Radioaktivität. Letztere wird von 3–5-proz. Albumin ebenso wie von 1:4 verdünntem Serum praktisch vollständig adsorbiert und als konstante Größe im Überstand gehalten. Alle ACTH-J<sup>131</sup>-Chargen enthalten nach der zweiten Reinigung nicht mehr als 2–4% unspezifische Radioaktivität (Tab. 2).

*Wachstumshormon* wurde in der gleichen Weise wie Insulin und ACTH markiert und auf einer Sephadex-Säule (G-25 oder G-50) von überschüssigem NaJ<sup>131</sup> getrennt. Obwohl bei der Markierung die Oxydationszeit auf 10 Sek. reduziert und alle Schritte der Markierung und Reinigung im Kälteraum bei + 4° durchgeführt wurden, lag die unspezifische Radioaktivität der STH-J<sup>131</sup>-Chargen immer über den Werten, die bei Insulin und ACTH gefunden wurden.

Zur Reinigung wurde das Jod<sup>131</sup>-STH, wie bei den anderen Hormonen schon beschrieben, mit gefärbtem Serum versetzt, dem zum Schutze des Hormons gegen bakterielle Zersetzung 0,01% Merthiolat und zum Schutz der Sulfhydrylgruppen 0,5% Jodacetamid zugegeben worden waren. Anschließend wurden die Serumproteine vom Jod<sup>131</sup>-STH auf Säulen von Sephadex G-75 oder G-100 (25–35 cm hoch, 1 cm Ø) getrennt. Im milliliterweise gesammelten Filtrat findet man einen Radioaktivitätsgipfel bei den Serumproteinen und einen folgenden zweiten, das STH-J<sup>131</sup>. Nach Inkubation des STH-J<sup>131</sup> (2. Gipfel im Sephadexfiltrat) mit Anti-STH-Kaninchenserum findet man im Radioelektropherogramm einen scharfen Gipfel im Bereich der  $\gamma$ -Globuline. Nach Inkubation mit Kontrollserum aber ist die Radioaktivität in allen Eiweißfraktionen zu finden, besonders im Bereich der  $\alpha_2$ -Globuline.

In der Probe mit Anionenaustauschern zeigt dieses STH-J<sup>131</sup> ebenfalls viel mehr Radioaktivität im Überstand als Insulin-J<sup>131</sup> und ACTH-J<sup>131</sup>, die sich durch weitere Reinigungen nicht wesentlich verringern läßt (Tab. 3).

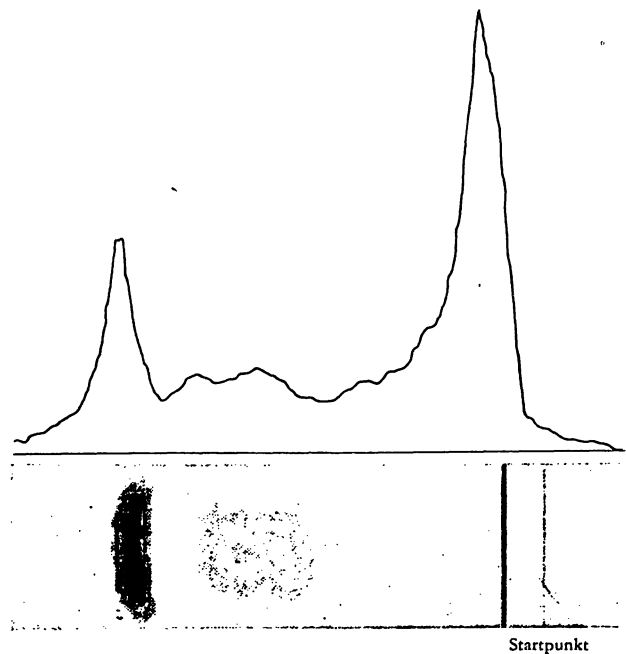


Abb. 6

Radioelektropherogramm eines Normalserums nach zwölfstündiger Inkubation mit ungereinigtem J<sup>131</sup>-ACTH (Schweine-ACTH A<sub>1</sub>). Das intakte J<sup>131</sup>-ACTH-Molekül wird von der Zellulose des Elektrophoresestreifens am Startpunkt adsorbiert, während die unspezifische Radioaktivität mit den einzelnen Serumeiweißfraktionen wandert

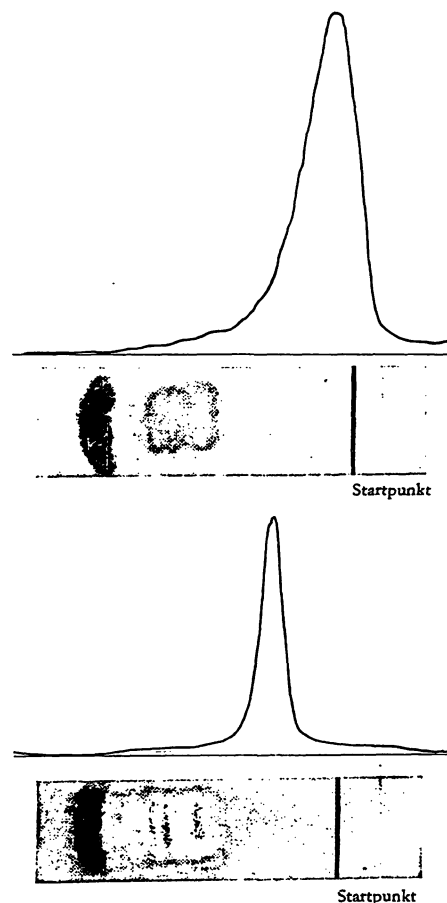


Abb. 7

Radioelektropherogramm eines Normalserums (oben) und eines Kaninchen-anti-Schweine-ACTH-Serums (unten) nach Inkubation mit gereinigtem J<sup>131</sup>-ACTH (460 mC/mg).

Die unspezifische Radioaktivität (vgl. Abb. 6) ist beseitigt, man sieht nur noch den hormonspezifischen Radioaktivitätsgipfel am Startpunkt bzw. über den  $\gamma$ -Globulinen des Antiserums

Tab. 2

Einfluß von Albumin, Serum und Kaninchen-anti-Schweine-ACTH-Serum auf die Adsorption der Radioaktivität an Amberlite bei zwei J<sup>131</sup>-ACTH-Präparationen mit verschiedenem Reinheitsgrad (Werte in % Radioaktivität im Überstand)

	Puffer (Alb. 0,5%)	Puffer (Alb. 1%)	Puffer (Alb. 2%)	Puffer (Alb. 3%)	Puffer (Alb. 4%)	Puffer + norm. Ser. (1:4)	Kaninchen-anti- ACTH-Serum (1:100)
ACTH-J <sup>131</sup> 430 mC/mg 1. Reinigung	4,8	6,6	7,2	8,8	8,6	9,1	95
ACTH-J <sup>131</sup> 430 mC/mg 2. Reinigung	1,5	2,5	3,6	4,0	4,0	4,1	96

Tab. 3

Einfluß von Albumin, Serum und Kaninchen-anti-STH-Serum auf die an Albumin adsorbierte Radioaktivität des in Sephadex G-100 gereinigten STH-J<sup>131</sup> (Werte in % Radioaktivität im Überstand)

	Puffer (Alb. 0,5%)	Puffer (Alb. 4%)	Serum (1:4)	Kaninchen-anti- STH-Serum (1:400)
Radioaktivität an Serumproteine gebunden (1. Gipfel in Sephadex G-100)	30	50	75	94
STH-J <sup>131</sup> (2. Gipfel in Sephadex G-100)	6	10	18	96

Auch die bei der Reinigung an Serumproteine gebundene Radioaktivität (1. Gipfel im Sephadexfiltrat) reagiert, wenn auch schwächer als die STH-J<sup>131</sup>-Fraktion, mit Anti-STH-Serum. Es scheint, daß im Gegensatz zu Insulin-J<sup>131</sup> und ACTH-J<sup>131</sup> intaktes STH-J<sup>131</sup> an Serumproteine gebunden wird.

## Diskussion

In der Einleitung sind die wichtigsten Maßstäbe, nach denen eine zum Zwecke der radioimmunologischen Bestimmung durchgeführte Markierung beurteilt werden muß, zusammengestellt worden, nämlich die Erhaltung der immunologischen Eigenschaften, eine hohe spezifische Aktivität und die Begrenzung der unspezifischen Radioaktivität in den Jod<sup>131</sup>-Hormonpräparaten.

Den ersten beiden Forderungen wird die von GREENWOOD und Mitarbeitern angegebene Methode vollauf gerecht. Mit der relativ einfachen Technik war es möglich, trotz des Arbeitens mit geringer Gesamtaktivität (2—4 mC) Insulin, ACTH und STH mit hoher spezifischer Radioaktivität (200—700 mC/mg) zu markieren.

Bei Hormonpräparationen mit solch hoher spezifischer Aktivität bleiben die immunologischen Eigenschaften ebenso erhalten wie bei Präparationen mit niedriger spezifischer Radioaktivität (10—50 mC/mg).

Dieser Punkt ist deshalb von Bedeutung, da die Unversehrtheit der für die Antigen-Antikörper-Reaktion notwendigen Molekülstruktur Voraussetzung für die Affinitätsähnlichkeit ist, die markiertes und unmarkiertes Hormon im Meßversuch zum Antikörper haben

müssen. Hohe spezifische Radioaktivität ist für einige Bestimmungsverfahren (7, 1, 2) unabdingbar. Daneben sind andere Methoden entwickelt worden, die bei Gebrauch von J<sup>131</sup>-Hormonen mit niedriger spezifischer Aktivität (20—40 mC/mg) schon zufriedenstellende Ergebnisse liefern (3, 4, 5). Zu den letzteren gehört auch die beschriebene Anionenaustauscher-Methode. Sie hat den Vorteil, auf kostspielige Laboreinrichtungen, wie sie der Umgang mit hoher Radioaktivität erfordert, verzichten zu können. Auch werden niedrig markierte Hormone von einigen Firmen schon kommerziell angeboten, so daß die Markierung im eigenen Labor eingespart werden kann.

Immer aber bringt das Arbeiten mit hoher spezifischer Aktivität eine Erhöhung der Empfindlichkeit mit sich. Denn bei starker Antiserumverdünnung und bei Einsatz des Tracers in kleinsten Mengen kann das Gleichgewicht zwischen antikörpergebundenem und freiem Jod<sup>131</sup>-Hormon noch von extrem geringen Mengen des nicht markierten bzw. endogenen Hormons merklich verschoben werden. So lag die untere Grenze der Insulinbestimmung im Bereich von 5,0—2,5  $\mu$ E/ml bei kommerziell erhältlichem Jod<sup>131</sup>-Insulin mit niedriger spezifischer Aktivität (20—40 mC/mg), während sie durch Verwendung von hoch markiertem Jod<sup>131</sup>-Insulin (200 bis 500 mC/mg) auf den Bereich von 1,0—0,5  $\mu$ E/ml gesenkt werden konnte (10). Bei der radioimmunologischen Bestimmung von ACTH (ebenfalls mit der Anionenaustauschertechnik) lagen bei Verwendung von Jod<sup>131</sup>-ACTH mit hoher spezifischer Aktivität (etwa 450 mC/mg) die niedrigsten gemessenen Werte im Bereich von 0,05—0,1  $\mu$ g/ml.

Neben der Erhaltung der immunologischen Eigenschaften und der Erzielung hoher spezifischer Aktivität ist als dritte Forderung die Begrenzung resp. Beseitigung der unspezifischen Radioaktivität nicht zu vernachlässigen. Ihr prozentualer Anteil an der Gesamtaktivität einer Jod<sup>131</sup>-Präparation ist bei den einzelnen Hormonen und von Markierung zu Markierung verschieden, liegt aber direkt nach der Markierung selten unter 15%. Da sie unspezifisch an Serumproteine gebunden wird, bleibt sie nach der Amberlite-Trennung im Überstand zusammen mit dem antikörpergebundenen J<sup>131</sup>-Hormon. Deshalb ist es grundsätzlich angezeigt, diese unspezifische Radioaktivität zu beseitigen. Hierzu haben sich die Adsorption an Serum und die anschlie-

Bende Abtrennung der Serumproteine vom Jod<sup>131</sup>-Hormon auf Sephadex-Säulen gut bewährt. Nach zwei Reinigungen lag die unspezifische Aktivität des Jod<sup>131</sup>-Insulins immer unter 6%, die des Jod<sup>131</sup>-ACTH unter 5%.

Die dann noch verbleibende unspezifische Radioaktivität erhöht unspezifisch in den serumhaltigen Bestimmungsansätzen die B-Werte (= antikörpergebundenes Jod<sup>131</sup>-Hormon) gegenüber den serumfreien Standardserien. Um diesen Unterschied auszugleichen, empfiehlt es sich, den Standardproben so viel Albumin zuzusetzen, daß die unspezifische Radioaktivität auch in den serumfreien Proben nach Möglichkeit vollständig an Proteine (Albumin) adsorbiert wird und als konstanter Faktor im Überstand bleibt.

Nach der Markierung von STH ist der Prozentsatz der Radioaktivität, der an die Proteine eines Normalserums gebunden wird, immer wesentlich höher (15–30%) als bei Insulin-J<sup>131</sup> und ACTH-J<sup>131</sup>. Diese Radioaktivität läßt sich durch Reinigung auf einer Sephadex-Säule (G-75 oder G-100) nicht merklich vermindern. Auch nach zwei Reinigungen werden noch 15–20% der Radioaktivität von Normalserum gebunden. Deshalb werden sie nicht vom Anionenaustauscher erfaßt, sondern bleiben im Überstand. In der Papierelektrophorese wandern sie mit den Serumproteinen, vor allem mit den  $\alpha_2$ -Globulinen. Ob es sich bei dieser proteingebundenen Radioaktivität um intaktes J<sup>131</sup>-STH oder um seine Spaltprodukte handelt, vermögen wir nicht zu entscheiden.

In jedem Fall stört diese Bindung die Bestimmung von STH im Serum. Durch sie wird das Verhältnis von antikörpergebundenem und freiem J<sup>131</sup>-STH unspezifisch verschoben und besonders die Messung des STH-Gehaltes von Nüchternseren erschwert. HADDEN und PROUT haben die Bindung von J<sup>131</sup>-STH an Serumproteine eingehend untersucht. Inkubierten sie J<sup>131</sup>-STH mit niedriger spezifischer Aktivität in menschlichem Normalserum, so fanden sie einen Teil der Radioaktivität an  $\alpha_2$ -Makroglobuline gebunden. Diese Radioaktivität reagierte mit anti-STH-Serum und wird deshalb von ihnen für Wachstumshormon gehalten. Auch von der Radioaktivität hoch markierten J<sup>131</sup>-STHs wurde ein Teil an  $\alpha_2$ -Makroglobuline gebunden, jedoch reagierte dieser Teil nicht mit anti-STH-Serum. Eine Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten der J<sup>131</sup>-STH-Präparationen von verschiedener spezifischer Aktivität konnte nicht erbracht werden.

Bei J<sup>131</sup>-Insulin und J<sup>131</sup>-ACTH haben wir niemals eine Bindung des intakten Hormonmoleküls an die Proteine eines Normalserums beobachtet, wie sie von einigen Autoren (16, 17) für Insulin beschrieben worden ist. Wohl aber werden die Degradationsprodukte, die sich bei der Markierung gebildet haben, von Proteinen adsorbiert. Sie reagieren nicht mit Antiserum und können, wie unsere Ergebnisse zeigen, leicht beseitigt werden. Im Falle des STH-J<sup>131</sup> dagegen erlauben uns unsere Ergebnisse nicht, mit Sicherheit die Frage zu beantworten, ob das intakte J<sup>131</sup>-markierte Hormonmolekül an Proteine gebunden wird oder nicht (18).

### Literatur

1. YALOW, R. S. und S. A. BERSON, *Nature* (London) **21**, 1648 (1959). — 2. YALOW, R. S. und S. A. BERSON, *J. Clin. Invest.* **39**, 1157 (1960). — 3. GRODSKY, G. M. und P. H. FORSHAM, *J. Clin. Invest.* **39**, 1070 (1960). — 4. HALES, C. N. und P. J. RANDLE, *Biochem. J.* **88**, 137 (1963). — 5. MORGAN, C. R. und A. LAZAROW, *Diabetes*, N. Y. **12**, 115 (1963). — 6. UTIGER, R. D., M. L. PARKER und W. H. DAUGHDAY, *J. Clin. Invest.* **41**, 254 (1962). — 7. HUNTER, W. M. und F. C. GREENWOOD, *Biochem. J.* **91**, 43 (1964). — 8. MEADE, R. C. und H. M. KLITGAARD, *J. nuclear Med.* **3**, 407 (1962). — 9. MELANI, F., H. DITSCHUNEIT, K. M. BARTELT, H. FRIEDRICH und E. F. PFEIFFER, *Klin. Wschr.* **43**, 948 (1965). — 10. MELANI, F., K. M. BARTELT, F. SORGE und E. F. PFEIFFER, *Acta Diab. Lat.* **1**, 402 (1964). — 11. GREENWOOD, F. C., W. M. HUNTER und J. S. GLOVER, *Biochem. J.* **89**, 114 (1962). — 12. PFEIFFER, E. F., F. MELANI, H. DITSCHUNEIT und K. SCHÖFFLING, *Bull. Schweiz. Akad. med. Wiss.*, im Druck. — 13. MELANI, F., K. M. BARTELT und E. F. PFEIFFER, im Druck. — 14. HADDEN, D. R. und T. E. PROUT, *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **116**, 110 (1965). — 15. HADDEN, D. R. und T. E. PROUT, *Bull. Johns Hopkins Hosp.* **116**, 122 (1965). — 16. GEERLING, H. und O. V. SIREK, *Studies of I<sup>131</sup>-insulin binding by serum proteins*. 5. Congress of the Internat. Diabetes Federation. Toronto, Canada July 20–24. 1964. — 17. PROUT, T. E., V. V. ODAK, G. J. DENDRINOS und D. H. LOCKWOODS, *Diabetes*, N. Y. **12**, 144 (1963). — 18. MELANI, F., R. CONRADS, F. SORGE, K. M. BARTELT und E. F. PFEIFFER, 71. Tag. Dtsch. Ges. Inn. Medizin Wiesbaden, 26–29. April 1965.

Professor Dr. med. E. F. Pfeiffer  
6 Frankfurt/Main-S. 10, Ludwig-Rehn-Str. 14